

## BRAF(V600E) 돌연변이 갑상선 역형성암에서 BRAF(V600E) 억제에 의한 EGFR 발현 증가가 표적치료에 대한 저항성발현과 상피-간질세포이행과정에 미치는 영향분석

Mechanism of Resistance and Epithelial to Mesenchymal Transition of BRAF(V600E) Mutation Thyroid Anaplastic Cancer to BRAF(V600E) Inhibition Through Feedback Activation of EGFR

저자	변형권 ; 나희정 ; 양연주 ; 박재홍 ; 권형주 ; 장재원 ; 반명진 ; 김원식 ; 신동엽 ; 이은직 ; 고윤우 ; 최은창
저널명	대한 두경부 종양 학회지 = Korean journal of head & neck oncology
발행기관	대한두경부종양학회
NDSL URL	<a href="http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/article/articleSearchResultDetail.do?cn=JAKO201434441682751">http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/article/articleSearchResultDetail.do?cn=JAKO201434441682751</a>
IP/ID	128.134.207.84
이용시간	2018/01/11 14:39:54

### 저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

# BRAF(V600E) 돌연변이 갑상선 역형성암에서 BRAF(V600E) 억제에 의한 EGFR 발현 증가가 표적치료에 대한 저항성발현과 상피-간질세포이행과정에 미치는 영향분석\*

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,<sup>1</sup> 병리학교실,<sup>3</sup> 내과학교실,<sup>4</sup>  
순천향대학교 의과대학 이비인후과학교실<sup>2</sup>

변형권<sup>1</sup> · 나휘정<sup>1</sup> · 양연주<sup>1</sup> · 박재홍<sup>2</sup> · 권형주<sup>3</sup> · 장재원<sup>1</sup>  
반명진<sup>1</sup> · 김원식<sup>1</sup> · 신동엽<sup>4</sup> · 이은직<sup>4</sup> · 고윤우<sup>1</sup> · 최은창<sup>1</sup>

= Abstract =

## Mechanism of Resistance and Epithelial to Mesenchymal Transition of BRAF(V600E) Mutation Thyroid Anaplastic Cancer to BRAF(V600E) Inhibition Through Feedback Activation of EGFR\*

Hyung Kwon Byeon, MD<sup>1</sup>, Hwi Jung Na, BS<sup>1</sup>, Yeon Ju Yang, PhD<sup>1</sup>, Jae Hong Park, MD<sup>2</sup>,  
Hyeong Ju Kwon, MD, PhD<sup>3</sup>, Jae Won Chang, MD<sup>1</sup>, Myung Jin Ban, MD<sup>1</sup>, Won Shik Kim, MD<sup>1</sup>,  
Dong Yeob Shin, MD<sup>4</sup>, Eun Jig Lee, MD, PhD<sup>4</sup>, Yoon Woo Koh, MD, PhD<sup>1</sup>, Eun Chang Choi, MD, PhD<sup>1</sup>  
*Departments of Otorhinolaryngology<sup>1</sup> and Pathology<sup>3</sup> and Internal Medicine,<sup>4</sup> Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*  
*Department of Otorhinolaryngology,<sup>2</sup> Soonchunhyang University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background and Objectives** : Anaplastic thyroid carcinoma(ATC) is a rare but highly aggressive thyroid malignancy that is associated with an extremely poor survival despite the best multidisciplinary care. BRAF(V600E) mutation is detected in about a quarter of ATC, but unlike its high treatment response to selective BRAF inhibitor (PLX4032) in metastatic melanoma, the treatment response of ATC is reported to be low. The purpose of this study is to investigate the innate resistance mechanism responsible for this low treatment response to BRAF inhibitor and its effect on epithelial-mesenchymal transition(EMT).

**Materials and Methods** : Two ATP cell lines, 8505C and FRO were selected and treated with PLX4032 and its drug sensitivity and effects on cell migration and EMT were examined and compared. Further investigation on the changes in signals responsible for the different treatment response to PLX4032 was carried out and the same experiment was performed on both orthotopic and ectopic xenograft mouse models.

**Results** : FRO cell line was more sensitive to PLX4032 treatment compared to 8505C cell line. The resistance to BRAF inhibition in 8505C was due to increased expression of EGFR. Effective inhibition of both EGFR and p-AKT was achieved after dual treatment with BRAF inhibitor(PLX4032) and EGFR inhibitor(Erlotinib). Similar results were confirmed on in vivo study.

**Conclusion** : EGFR-mediated reactivation of the PI3K/AKT pathway and MAPK pathway contributes to the relative insensitivity of BRAF(V600E) mutant ATC cells to PLX4032. Dual inhibition of BRAF and EGFR leads to sustained treatment response including cell invasiveness.

**KEY WORDS** : BRAF · EGFR · Epithelial-mesenchymal transition · Thyroid anaplastic cancer.

**Received** : September 29, 2014 / **Accepted** : October 7, 2014

\*본 연구는 연세대학교 의과대학 교내연구과제의 일환으로 수행하였음(과제번호 6-2010-0028).

교신저자 : 고윤우, 120-752 서울 서대문구 연세로 50 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (02) 2228-3607 · 전송 : (02) 393-0580 · E-mail : ywkohent@yuhs.ac

## 서론

갑상선암은 내분비계에서 발생하는 가장 흔한 악성 종양으로 여성이 남성에 비해 3배 정도 많이 발생하는 것으로 알려져 있다. 최근 전세계적으로 갑상선암 발생률이 급증하는 것으로 보고되고 있으며, 우리 나라의 경우 그 증가율이 매우 높아서 2011년 여성암 발생률 1위를 보이고 있다.<sup>1)</sup> 전체 갑상선암종의 약 2~5%를 차지하는 역형성암은 흔하지 않지만 고도로 침습적이며, 분화성 갑상선암의 치료를 근간을 이루는 수술적 치료, 술후 방사성 동위원소치료 및 L-thyroxine 치료는 물론이고 적극적인 방사선 치료나 항암요법의 다학제간의 치료에도 불구하고 진단 후 평균 생존율이 약 5개월일 정도로 그 예후가 극히 불량하다.<sup>2)</sup> 이는 진단 초기에 이미 국소 전이나 폐, 뼈, 간 등으로의 전신 전이가 급속도로 진행하기 때문이다.

갑상선의 종양 발생 과정(tumorigenesis)에 다양한 유전적인 변이가 관여되고 있음이 보고되고 있다.<sup>3)</sup> 갑상선 체세포 돌연변이에는 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호 전달체계가 관여하고 있는데, 유전적 변이로 인한 세포막의 RET tyrosine kinase가 MAPK 경로를 활성화시켜 세포내 신호전달인자인 RAS와 BRAF를 상향 조절하고, 이는 다시 mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase(MEK)와 extracellular single-regulated kinase(ERK)를 활성화시켜 세포증식, 분화 및 생존 등을 포함하는 다양한 세포내 기전에 대한 핵내 신호전달을 야기하게 된다. 갑상선암종에서 가장 많은 연구가 되고 가장 흔하게 발견되는 유전적인 이상이 BRAF 돌연변이다. BRAF는 RAS에 의해 활성화되고 결합되어 세포막에 전위된 세린(serine)-트레오닌(threonine) kinase로서 갑상선암에서 가장 흔하게 발견되는 변이는 600번 아미노산인 발린(valine)이 글루탐산(glutamic acid)으로 치환된 것(V600E)으로 1799번 뉴클레오티드의 점 돌연변이가 원인이다. BRAF(V600E) 돌연변이는 유두암에서 가장 흔하지만, 미분화암이나 역형성암의 1/3에서도 발견된다. BRAF 돌연변이는 BRAF kinase의 항시 작용, MEK과 ERK kinase의 인산화를 통해 MAPK 경로를 지속적으로 활성화시키며 최근 들어 많은 연구에서 BRAF 돌연변이와 갑상선암의 공격적인 임상 및 병리학적 특징, 즉 림프절 전이, 갑상선 피막의 침습, 진행된 임상병기, 종양 재발, 재수술, 암관련 사망 등과 상관 관계가 높다고 보고되고 있다. 특히, BRAF 돌연변이 암종이 재발한 경우나 미분화 양상을 보이는 경우, sodium iodide symporter의 기능 변화로 radioiodine avidity의 감소, 방사성 동위원소 치료의 저항성으로 이어지는 임상적인 특징을 보이는 경우가 많다.

BRAF(V600E) 돌연변이는 갑상선암 이외에도 악성 흑색종(melanoma)의 약 50%, 대장-직장암의 약 15%, 모양세포성

백혈병(hairy-cell leukemia)의 거의 모든 경우에서도 발견된다.<sup>4-6)</sup> 최근 들어 선택적 BRAF 억제제인 PLX4032(Vemurafenib)의 BRAF(V600E) 돌연변이 전이성 악성 흑색종(metastatic melanoma)에 대한 적용이 미국 FDA의 승인을 받게 되면서 환자들의 약 80%에서 progression-free survival과 overall survival을 향상시킬 수 있음이 보고되었고, 모양세포성백혈병(hairy-cell leukemia)에서도 치료반응이 향상됨을 발견하였다.<sup>7,8)</sup> 비록 PLX4032와 같은 BRAF 억제제의 투여가 BRAF 돌연변이 악성 흑색종에서 높은 치료반응을 보인데 반해, 다른 BRAF 돌연변이 고형암종에서의 효과는 미미한데, 가령 BRAF 돌연변이 대장-직장암 환자에서의 PLX4032의 효과는 약 5%에 지나지 않으며, MEK 억제제의 하나인 Selumetinib은 기대와는 달리 갑상선암종에서 그 효과가 전혀 없는 것으로 알려져 있다.<sup>9,10)</sup> 이처럼 치료반응이 상이한 것은 표적 치료제에 대한 내인성 저항성 기전이 발현된다는 사실을 밝힌 바 있는데, 가령 BRAF 돌연변이 대장-직장암에서 BRAF 억제를 하면 동일하게 일시적인 ERK 신호 억제 현상이 일어나며 곧 다시 증가(rebound)하게 되는데 이는 HER1(EGFR) 신호 상승에 의한 MAPK 경로를 재활성화하는 것에 기인한 것으로 알려져 있다. 즉, oncogenic BRAF가 CDC25C를 유도하여 HER1(EGFR)의 발현이 억제되고 있으나 PLX4032를 투여하면 BRAF 억제를 통해 CDC25C 발현이 억제되고 따라서 HER1(EGFR)의 발현이 증가하게 되는 것이다.<sup>11)</sup> 또한 BRAF 돌연변이 대장-직장암에서 EGFR, HER2, MET, insulin-like growth factor 1 receptor(IGF1R)와 같은 다양한 receptor tyrosine kinase(RTK)의 발현이 증가된다는 사실이 밝혀져 있다.<sup>12,13)</sup> 이 사실을 토대로 BRAF 돌연변이 대장-직장암에서 BRAF와 EGFR의 동시 억제(dual inhibition)을 하게 되면 지속적인 MAPK 신호 억제와 더불어 내인성 저항 기전을 극복하여 치료 효과가 증가되는 것을 알 수 있었다.<sup>13)</sup>

본 연구에서는 대장-직장암에서와 마찬가지로 갑상선암에서도 BRAF 억제제에 대한 치료 반응의 저항성을 보이는 사실에 대해 아직까지 연구가 미진하였던 그 내인성 저항 기전을 구체적으로 밝혀 표적 치료의 효과를 극대화하는 데 그 목적이 있다. 특히 BRAF 돌연변이 갑상선 역형성암 세포주인 8505C와 FRO에서 BRAF 억제제 투여시 유발되는 되먹임(feedback) 조절기전의 발현 및 상부 신호전달체계를 확인하고 더 나아가 다른 연구에서는 보고된 바 없는 이러한 내인성 저항 기전을 통해 상승된 신호전달이 상피-간질세포이행(epithelial-mesenchymal transition ; EMT)과 관련된 암세포의 침습능에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 또한 이를 토대로 병합요법(combinatorial therapy)을 통한 이중 억제(dual inhibition)의 효과를 살펴보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 배양

갑상선 역형성암 세포의 PLX4032에 대한 약물 감수성을 확인하기 위해 BRAF(V600E) 돌연변이를 가진 갑상선 역형성암 세포주인 8505C, FRO를 선택하여 실험하였다. 8505C, FRO 세포주를 10% RPMI 배지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양하였다.

### 2. Western blot analysis를 통한 EGFR의 발현과 EGFR inhibitor를 통한 발현억제 확인

역형성암 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 다음, lysis buffer[10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate](Invitrogen, Camarillo, CA), 1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride(PMSF)와 protease inhibitors cocktail(Sigma)을 넣고 harvest하였다. 이 단백질을 13,200 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 Western blot analysis에 이용하였는데 단백질의 양은 Pierce BCA Protein Assay Kit(Thermo)를 이용하여 측정하였다. Well 당 30 µg의 단백질을 분리하기 위해 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 사용하여 분리한 후 p-EGFR(1 : 1,000), p-AKT(1 : 1,000), p-ERK(1 : 1,000), vimentin(1 : 1,000), GAPDH(1 : 1,000)에 옮긴 다음 4°C에서 밤새도록 반응시켰다. 다음날 0.1% Tween-20이 함유된 Tris buffered saline(TBS) 용액으로 세척한 후 second rabbit antibody(Jackson)와 anti-mouse antibody(Jackson)로 각각 반응시킨 후 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo) 이용하여 X-ray film으로 확인하였다.

### 3. MTT assay

96 well plate에 thyroid cell를 well당  $1 \times 10^3$  cells로 seeding 한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1일간 배양하였다. 각 sample 당 BRAF inhibitor를 0.3 µM로 처리한 뒤 incubator에서 24, 48시간 배양하였다. Well당 2 mg/mL의 MTT solution을 처리한 뒤 4시간 incubator에서 배양 후 well당 100 µg DMSO 첨가하고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. Wound healing assay

6 well plate에 thyroid cell을 well당  $1 \times 10^5$  cells로 seeding 한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1일간 배양하였다. Cell이 90%가 되면 PLX4032을 3, 6시간 처리 후 새 배지로 바뀐 뒤 plastic pipette tip을 이용하여 cell monolayers에 scratch를 내고, 24시간 incubation한 후 cell migration정도를 현미경으

로 확인하였다.

### 5. 면역화학염색에 의한 분석(Immunohistochemical analysis)

Mouse tumor 조직을 paraffin section하여 xylene와 ethanol으로 deparaffinization시켰다. Antigen retrieval 15분, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10분, blocking(10% normal goat serum+0.01% BSA+dilution) 1시간 반응시킨 후 1차 antibody EGFR, AKT(1 : 200) 처리하고 4°C incubation하에 밤새 반응시켰다. 2차 antibodies rabbit(1 : 500) 1시간 처리 후 DAB histochemistry kit(Life technologies)를 이용해 반응시켰다. 그 후 hematoxylin 염색하고 slide에 mounting solution(DAKO)을 처리하여 현미경으로 관찰하였다.

### 6. FACSscan with Annexin V-FITC/PI staining

6 well에  $3 \times 10^5$  cells를 seeding하여 배양한 뒤 24시간 동안 starvation 시킨 후 PLX4032를 농도(3, 5 µM) 별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후 배양한 cell을 1.5 mL tube로 옮겨 Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I(Bio-vision) binding buffer와 Annexin V-FITC를 첨가해 주었다. 5분간 상온에서 반응 후, BD FACSVerser(Flow cytometer) 장비를 이용해 세포사멸(apoptosis)의 정도를 측정하였다.

### 7. RT-PCR

RNA cultured cell에 TRIzol(Invitrogen, Burlington, ON, CA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 그 후에 random primers and MuLr reverse transcriptase(Roche)을 이용해서 cDNA를 추출하였다. Vimentin ; forward 5'-GAG AACTTTGCC-GTTGAAGC-3', reverse 5'-GCTTCCTGTAGGTG-GCAATC-3.

### 8. 정위적 이종이식 마우스 모델(Orthotopic xenograft mouse model)

8505C와 FRO 세포주를 harvest 후  $1 \times 10^5$ 의 cell을 5 µL PBS에 풀어 6주된 수컷 누드 마우스(Orientbio Inc., Seongnam-si, Korea) 갑상선에 Hamilton syringe(Hamilton Company, Reno, NV, USA)을 사용하여 주입하였다. 주입 후 3주 동안 PLX4032를 9회 투여하였다. 안락사 후 조직을 이용하여 Western blot analysis와 immunohistochemical analysis를 수행하였다. 동물 실험의 모든 절차는 연세대학교 의과대학 실험동물부 윤리 위원회의 승인을 받았다. 모든 실험에 사용된 동물은 연세대학교 의과대학 실험동물부의 관리와 사용의 가이드 라인에 맞춰서 실험이 진행되었다.

### 9. Chemotaxis

Cell harvest 후 Cell Migration Chamber Plate에  $7.5 \times 10^4$ /



well로 cell을 넣어준 후, 37°C CO<sub>2</sub> incubator 4시간 동안 반응시켰다. 그리고 150 µL prewarmed Cell Detachment Solution에 상온에서 30분간 반응시켰다. 4X Lysis Buffer로 희석된 CyQuant GR Dye 1 : 75과 50 µL Lysis buffer/Dye Solution을 섞어 넣어 준 뒤 상온에서 15분간 반응시켰다. 새로운 96 well에 옮긴 후 480/520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 10. TUNEL assay

1% PFA 함유된 PBS(pH 7.4)로 상온에서 10분 동안 고정시키고 세척 후 5 µL TUNEL Enzyme와 45 µL TUNEL Label을 섞은 후 37°C incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 515~565 nm에서 confocal microscopy로 관찰하였다.

#### 11. 면역 형광(Immunofluorescence)

6 well plate에 cell을 1×10<sup>5</sup>/well로 seeding한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1일간 배양하였다. PLX4032 처리 후 media suction 후 paraformaldehyde를 넣은 뒤 상온에서 20분간 고정하였다. 1% Triton을 5분간 처리 후, blocking(PBS+1% BSA+ 10% Normal goat serum) 1시간, 이어서 1차 antibody(1 : 200)를 넣고 4°C에서 밤새도록 반응시켰다. 2차 antibody(1 : 500) 3시간 처리한 후 450 nm에서 confocal microscopy로 관찰하였다.

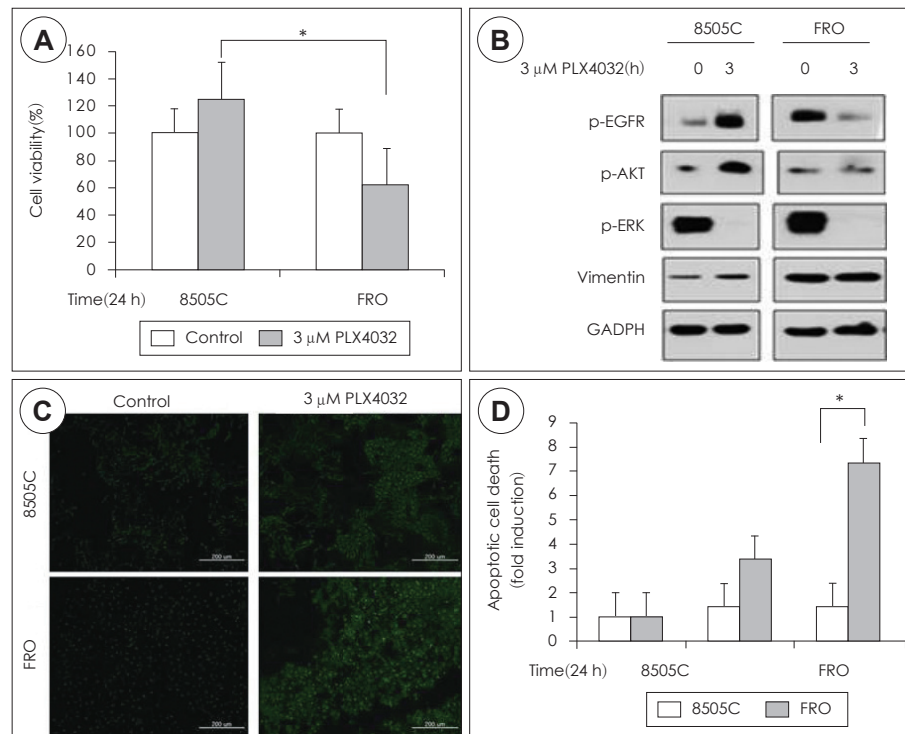
## 결 과

### 1. 역형성 갑상선암 세포주의 PLX4032 약물 감수성 분석

8505C, FRO 세포주에 PLX4032를 24시간 처리하여 세포의 생존율을 MTT assay로 확인한 결과, 8505C가 약물 처리에도 불구하고 약간의 세포 증식을 보였고 반면 FRO는 약 40%의 세포 사멸을 보였다(Fig. 1A). Western blot analysis로 p-EGFR 발현을 확인해본 결과 8505C에서 p-EGFR 발현이 현저히 증가되었고 FRO에서는 오히려 감소하였다. 두 세포주에서 p-ERK의 발현 감소로 PLX4032 약물이 작용하는 것을 알 수 있었다. 8505C에서는 p-EGFR 발현 증가에 따라 p-AKT가 증가하였고 EMT 주요 인자인 vimentin 발현 역시 증가하였다(Fig. 1B). PLX4032에 의해 유도되는 세포 사멸(apoptosis)을 TUNEL assay로 측정한 결과, 8505C가 FRO에 비해 세포 사멸 현상이 적게 일어나는 것을 확인하였다(Fig. 1C). Apoptosis를 측정할 수 있는 Annexin V-FITC/PI staining을 통해서도 같은 결과를 확인할 수 있었다. PLX4032를 농도별로 24시간 처리하였을 때 8505C가 FRO에 비해 농도에 영향을 받지 않고 생존하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 1D).

### 2. PLX4032에 의한 종양세포의 세포 이동성 및 EMT 증가

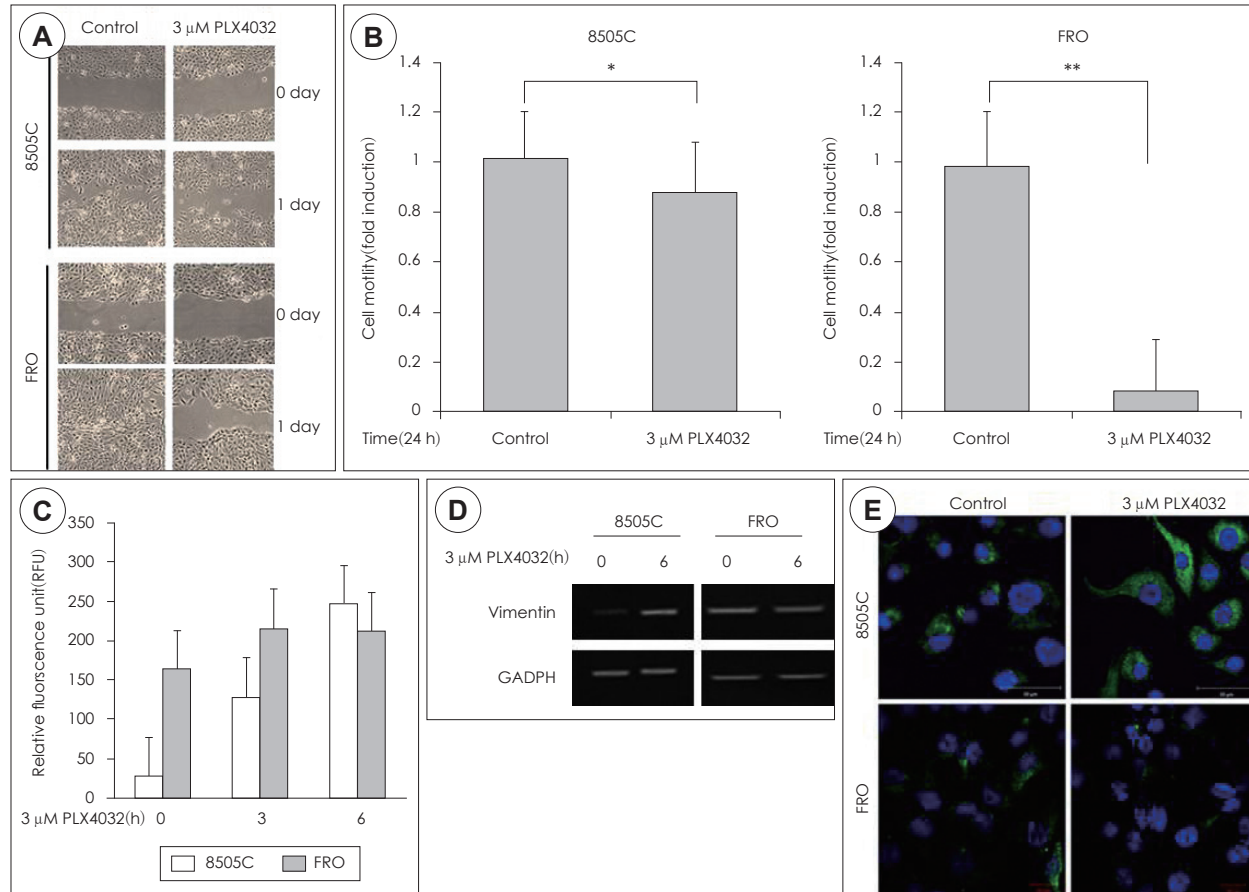
PLX4032 약물 감수성이 8505C, FRO의 세포 이동성에 어



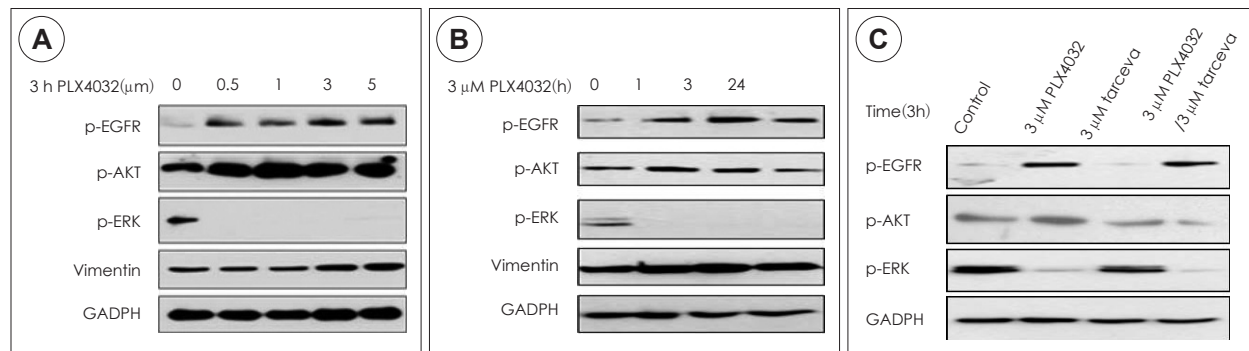
**Fig. 1.** Differential drug sensitivity of 8505C and FRO cell lines (anaplastic thyroid carcinoma with BRAF V600E mutation) to PLX4032 treatment. A : MTT assay done after treatment with 3 µM PLX4032 for 24 hours showed that the cell viability was higher for the 8505C(\* : p<0.05). B : Western blot analysis after treatment with 3 µM PLX4032 revealed that EGFR was increased in 8505C whereas it was decreased in FRO. Also p-AKT and vimentin were increased in 8505C but the proteins were no different in FRO. C : According to TUNEL assay, apoptosis was greater in FRO than 8505C. D : Analysis of apoptotic cell death with Annexin V-FITC/PI staining showed that apoptotic cell death level was substantially increased in FRO.

떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 wound healing assay를 시행하였다. DMSO를 처리한 경우, 8505C에 비해 FRO의 세포 이동이 활발하게 이루어지는 것을 보았다. 하지만, PLX4032를 처리하면 8505C는 세포 이동이 대조군과 비슷하게 일어

나는 반면에 FRO는 세포 이동이 상대적으로 크게 감소되었다 (Fig. 2A). 세포이동 거리를 측정해 정량적인 분석을 한 결과, 이런 경향을 뚜렷이 확인할 수 있었다. 8505C의 세포 이동성은 PLX4032에 의해 약간의 감소만을 보이지만 FRO는 현재



**Fig. 2.** Effects on cell motility and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in 8505C and FRO cell lines after PLX4032 treatment. A : Wound healing assay done after treatment with 3 μM PLX4032 for 24 hours showed that cell migration was increased in 8505C compared to FRO. B : The trend could be prominently recognized after quantitative analysis of the distance of cell migration (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ). C : According to cell chemotaxis assay, cell migration was greater in 8505C. D : RNA levels of vimentin were increased in 8505C after 3 μM PLX4032 treatment but the expressed levels were unchanged in FRO. E : Immunofluorescence assay for detection of intracellular expression of vimentin after 3 μM PLX4032 treatment showed markedly increased response in 8505C.



**Fig. 3.** Analysis of EGFR expression in 8505C cell line which influences drug sensitivity to PLX4032. A : Western blot analysis after each treatment with PLX4032 of increasing dose for 3 hours. p-EGFR expression showed increment together with p-AKT and vimentin while p-ERK expression was decreased. B : Similar results were noted after each treatment with 3 μM PLX4032 of increasing treatment time. Expressions of p-EGFR, p-AKT and vimentin were increased and p-ERK expression was decreased. C : Western blot analysis after each treatment with different regimen. Compared to the expression levels in control, p-EGFR and p-AKT expressions were increased while p-ERK level decreased after 3 μM PLX4032 treatment. Upon treatment with 3 μM Tarceva, p-EGFR and p-AKT decreased. After combination treatment of 3 μM PLX4032 and 3 μM Tarceva, p-EGFR expression level remained high while p-AKT and p-ERK expressions were inhibited.

하게 감소된 것을 확인하였다(Fig. 2B). Boyden Chamber를 이용한 cell migration assay에서도 같은 결과를 재확인할 수 있었다(Fig. 2C). 또한, PLX4032가 EMT에 영향을 주는지 보기 위해 EMT의 주요 인자인 vimentin의 RNA 발현량을 확인한 결과, 8505C에서만 vimentin의 발현이 증가되고 FRO에서는 변화가 없었다(Fig. 2D). 또한 vimentin의 세포내 발현을 면역형광 염색법으로 확인한 결과 8505C에서 약물에 의해 발현이 현저하게 증가되는 것을 보았다(Fig. 2E).

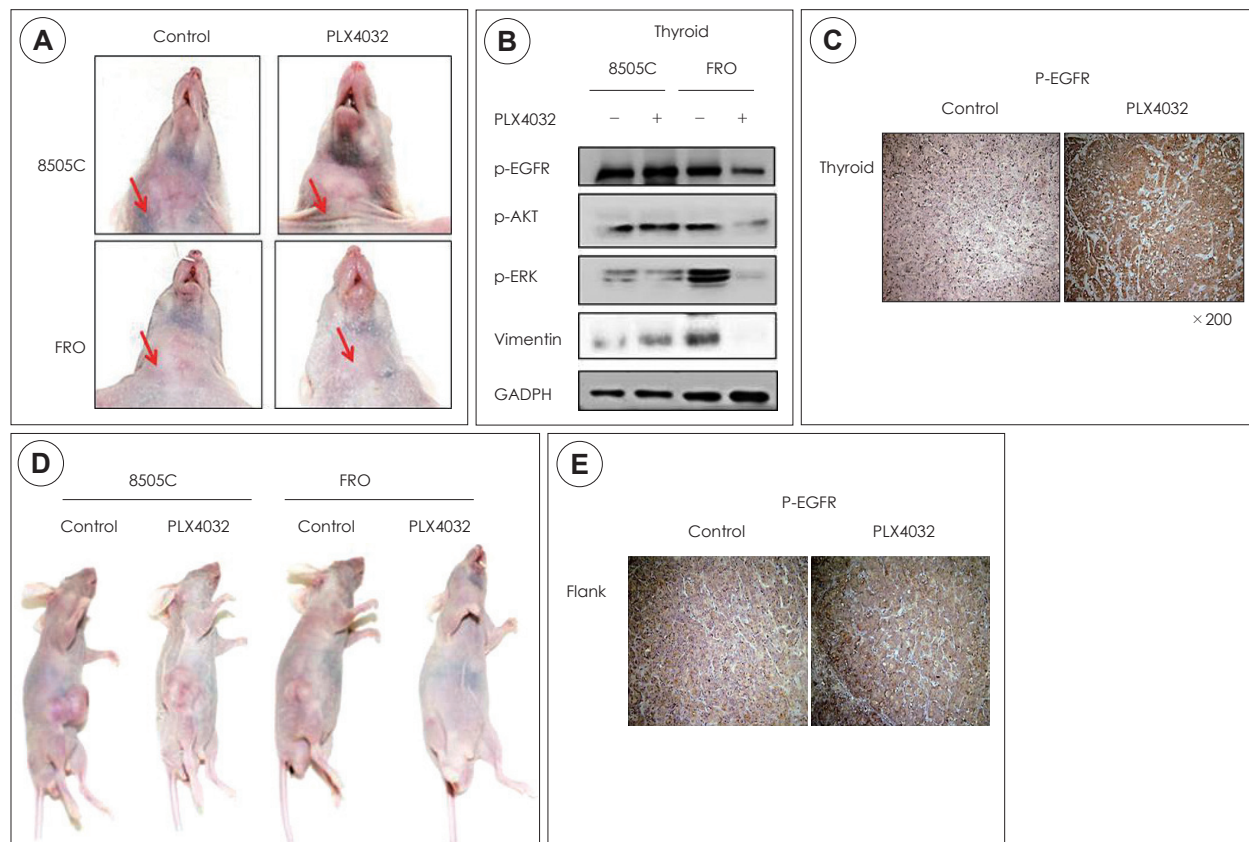
### 3. PLX4032 약물 감수성에 영향을 주는 EGFR 발현 분석

PLX4032에 의한 EGFR 활성 증가를 확인하기 위해 농도별, 시간별로 PLX4032를 8505C에 처리한 후 p-EGFR의 발현을 Western blot analysis로 확인하였다. PLX4032의 농도가 늘어난 경우, p-EGFR 발현 증가가 유지되었고 p-AKT 및 vimentin 발현 또한 함께 증가되었다(Fig. 3A). 시간별로 처리한 결과도 역시 p-EGFR의 발현이 3시간까지 순차적으로 증가하였고 24시간에서는 감소를 보였다(Fig. 3B). EGFR 억제제인 Erlotinib(Tarceva<sup>®</sup>)를 PLX4032와 함께 처리하면 PLX4032에

의해 증가되었던 p-EGFR이 감소되지 않고 발현하며 p-AKT의 발현은 현저히 감소하였다(Fig. 3C).

### 4. 이종이식 마우스 모델(Xenograft mouse model)에서의 PLX4032와 EGFR 관계 분석

8505C 또는 FRO 세포주를 nude 마우스의 갑상선에 주입하여 정위적(orthotopic) 이종 이식 마우스 모델을 만들었다. 세포 주입 3주 후에 종양 형성을 확인한 후, DMSO 또는 PLX4032를 3주동안(주3회) 처리하였다. 8505C에서는 PLX4032를 처리하여도 대조군에 비해 종양의 크기에 변화가 없거나 약간 커지는 경향을 보였고, FRO에서는 종양의 크기가 현저하게 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 종양 조직 내 단백질 발현량을 분석한 결과, PLX4032처리시 8505C에서는 p-EGFR는 변화가 없는 반면에 FRO에서는 현저히 감소되었다(Fig. 4B). p-AKT 및 vimentin의 발현 역시 8505C에서는 증가하였지만 FRO에서는 감소하였다. 또한, 면역 화학 염색법으로 종양 조직 내 p-EGFR 발현을 확인한 결과, PLX4032를 처리한 8505C의 조직 내에서 p-EGFR 발현이 증가되는 것을 볼 수



**Fig. 4.** Treatment response to PLX4032 in 8505C and FRO cell lines in a xenograft mouse model. A : Injection of PLX4032 after orthotopically injecting 8505C and FRO cell lines in nude mice showed different outcomes. The tumor was slightly increased or showed no change in the 8505C injected mice while prominent decrement in size was noted in the FRO injected mice. B : Analysis of the intratumoral protein expression after PLX4032 treatment revealed no change in p-EGFR in 8505C while the expression was notably decreased in FRO. Also, p-AKT and vimentin were increased in 8505C however the expressions were decreased in FRO. C : Immunohistochemical analysis of the p-EGFR expression showed that it was markedly increased in 8505C treated with PLX4032. D : Similar results were noted for the ectopic xenograft mouse model. After PLX4032 treatment, the 8505C tumor growth at the flank area showed minimal decrement but there was noticeable size shrinkage of the FRO tumor. E : Increased level of p-EGFR expression was confirmed in 8505C after PLX4032 treatment under immunohistochemistry.



있었다(Fig. 4C). 8505C 또는 FRO 세포주를 누드마우스의 측면(f flank)에도 주입하여 이소성(ectopic) 이종 이식 마우스 모델을 만들어 같은 방식으로 실험을 하였다. 갑상선 종양 형성과 같이 마우스 측면에 형성된 종양에서도 역시 PLX4032를 처리하면 8505C의 종양 크기가 약간 감소하는데 비해 FRO의 종양은 현저하게 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4D). 또한 8505C의 종양조직내 p-EGFR의 발현이 증가되는 것을 면역 화학 염색법으로 확인하였다(Fig. 4E).

## 고 찰

전체 갑상선암종의 약 5%를 차지하는 역형성암은 매우 공격적이며 여러 고식적인 치료에도 불구하고 반응이 낮아 극히 불량한 예후를 보인다. 더군다나 기존의 항암, 방사선요법은 치료 후 광범위한 조직의 섬유화, 창상 반흔, 부종 등의 심각한 후유증을 유발하고 연하 곤란, 음성 변화와 같이 특히 두경부 영역에 미치는 영향으로 인하여 환자 삶의 질의 저하를 초래하게 되는 경우가 빈번하여, 독성이 상대적으로 적고 반면에 종양 세포 특이적인 표적 치료제의 개발이 절실한 상황이다.

RAF kinase는 세포의 성장과 분화 그리고 악성화에 관여하는 RAS→MEK→MAP/ERK 신호 경로의 중요한자이다. RAF kinase 중 B type RAF(BRAF)는 이 신호 경로에 가장 강력한 활성화체이며 이 유전자는 염색체 7번에 위치한다. 갑상선암종에서 BRAF에 대한 여러 점돌연변이가 일어날 수 있는데 가장 흔한 것이 exon 15의 1799번 뉴클레오티드에서 티민(thymine)이 아데닌(adenine)으로 대체되는 변이로, 이로 인해 600번 아미노산이 발린(valine)에서 글루탐산(glutamic acid)으로 치환되는 것이다(V600E).<sup>3)</sup> BRAF(V600E) 돌연변이는 갑상선 역형성암의 약 26%에서 발견되는데, 이 외에도 대장암, 난소암, 폐암 그리고 간담도암에서도 낮은 수준으로 나타난다.<sup>14)</sup> BRAF 유전자 돌연변이가 종양의 발암 과정(carcinogenesis)에서의 역할 규명과 이를 기반으로 한 표적 치료제 개발을 위해 많은 연구가 이루어졌다. 대표적인 BRAF 선택 억제제인 PLX4032(Vemurafenib)가 BRAF(V600E) 돌연변이 보유 악성 흑색종의 80%에서 치료 효과를 보였으나 기타 다른 BRAF(V600E) 돌연변이 고형암종에서의 반응은 좋지 않아 이에 대한 약물의 저항 기전에 대한 연구 또한 많이 이루어졌다. Corcoran 등이 보고한 바에 의하면 BRAF 돌연변이 대장-직장암에서 PLX4032를 처리하였을 때 p-ERK 신호는 일시적으로 억제되었지만 EGFR를 통한 RAS와 CRAF가 활성화되어 이로 인해 ERK가 다시 급격히 재활성화되는 것을 발견하였다.<sup>13)</sup> 또한 p-EGFR 신호가 높게 발현이 되어 있는 것을 확인하였으며, 따라서 BRAF와 EGFR를 모두 억제하였을 때 MAPK 신호 경로를 효과적으로 억제하여 치료 효과를 높

일 수 있었다. 또한 Nehs 등은 마우스 모델에서 PLX4032가 BRAF 돌연변이 갑상선 역형성암 세포의 성장을 억제하였다고 보고하였다.<sup>15)</sup> Montero-Conde 등이 연구한 바에 따르면 역시 BRAF와 MEK 억제제를 사용하면 악성 흑색종에서는 지속적으로 ERK 신호가 억제되지만 BRAF 돌연변이 갑상선암 종에서는 일시적인 ERK 억제만이 이루어지며 이는 HER3 신호 증가에 의한 재활성화(rebound)에 기인한다고 보고하였다.<sup>16)</sup> 즉 HER3와 인접한 HER2 신호가 동시에 활성화되면서 이는 다시 RAS-ERK 신호 경로를 재활성화시키고 이러한 기전에 의해 BRAF 억제에 의한 세포성장 억제효과가 반감되는 것이라고 하였다. 이 과정에는 또한 HER3 리간드인 neuregulin-1(NRG1)가 PLX4032에 의하여 증가되며 이것이 또한 HER3 경로의 활성화에 기여한다고 보고하였다. 이러한 일화로 본 연구에서는 갑상선 역형성암에서도 BRAF 억제제에 대한 치료 반응의 저항성을 보이는 사실에 대해 아직까지 연구가 미진하였던 그 내인성 저항 기전을 구체적으로 밝혀 효과적인 표적 치료 요법을 모색하고자 하였다.

갑상선암종이 주위 조직으로 침윤하거나 원격 전이를 일으키는 경우 매우 불량한 예후를 반영하게 되기에 침습적인 전이성 갑상선암종으로의 성장과 진행에 관련된 기전을 정확히 이해하는 것이 효과적인 치료법 개발을 위해 중요하다. 최근 종양의 침습과 전이 과정에서 상피-간질세포이행(EMT)의 중요성이 강조되고 있는데, EMT 과정에 의하여 세포내 골격(cytoskeleton)의 재구성이 일어나고 세포모양이 상피양 형태에서 섬유아세포 형태로 변화되며 E-cadherin 의존성 세포간 유착이 약해지며 세포의 이동능이 증가되어 주위 조직으로의 침습이나 전이가 용이해진다. EMT 과정과 관련된 변화로는 vimentin, fibronectin, osteopontin의 발현 증가,  $\beta$ -catenin의 핵내 위치(nuclear localization), E-cadherin 발현의 감소, TGF- $\beta$ , c-Met, Snail, NF $\kappa$ B 신호의 강화, Rho GTPase(RhoA, CDC42, Rac)를 통한 actin과 intermediate filaments의 재구성(reorganization) 등이 있다.<sup>17)</sup> 따라서 본 연구에서는 BRAF 돌연변이 갑상선 역형성암에서 다른 연구에서는 보고된 바 없는 BRAF 억제제 투여시 유발되는 내인성 저항 기전을 통해 상승된 신호전달이 EMT와 관련된 암세포의 침습능에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 BRAF(V600E) 돌연변이 갑상선 역형성암종의 세포주인 8505C와 FRO 두 가지를 사용하여 각각 PLX4032를 처리하였을 때 그 변화 양상을 살펴보았다. 그런데 흥미롭게도 같은 역형성암 세포주임에도 불구하고 서로 상반된 반응을 보였는데 8505C에서는 PLX4032에 대해 치료 저항을 보이는 반면, FRO에서는 PLX4032를 처리하였을 때 세포사멸이 증가되어 높은 치료 반응을 보였다. 더 나아가 PLX4032를 투여하였을 때 두 세포주의 세포이동능과 EMT의 변화 양상에도 차이를 보였는데, 8505C에서는 세포 이동능이 변화 없거나



조금 감소한 반면, FRO에서는 세포 이동능이 크게 감소된 것을 확인할 수 있었으며, EMT의 표지자인 vimentin의 발현도 FRO는 변화가 없었으나 8505C에서는 증가되어 EMT가 상승된 것을 알 수 있었다. In vitro 연구에서 보인 상기 사실은 in vivo 동물 실험을 통해서도 같은 양상의 결과를 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 같은 BRAF 돌연변이 역형성암 세포 주입에도 이렇게 상이한 반응을 보이는 원인은 알 수 없으나 추후에 이에 대해 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 보인다.

이를 토대로 8505C에서는 선택적인 BRAF 억제제를 하였을 때, 내인성 저항 기전을 통해 약물 치료 반응이 떨어진다는 것을 유추할 수 있었고, 따라서 8505C에서 PLX4032를 농도별, 시간별로 처리하였을 때 보이는 신호 발현의 변화를 자세히 들여다본 결과, p-EGFR이 증가되고 이에 따라 p-AKT 또한 같이 발현이 증가된다는 사실을 확인할 수 있었다. 이와 더불어 vimentin의 발현 역시 PLX4032를 농도별로 시간별로 증가시켜 처리하였을 때 같이 증가되는 것을 알 수 있었다. 이 결과를 비추어 보았을 때 8505C에서는 BRAF를 억제했을 때 이로 인해 EGFR 발현이 증가되고 이는 다시 MAPK 경로 혹은 PI3K-AKT 경로를 재활성화를 한다는 점을 유추해볼 수 있었다. 본 연구 결과에서는 다만, 이전의 다른 연구에서 보인 것처럼 PLX4032를 처리하였을 때 감소되었던 p-ERK 신호가 다시 증가되는 현상(rebound phenomenon)을 보이지 않고 지속적인 억제를 보였는데, 이는 BRAF억제에 의한 EGFR 발현증가가 주로 PI3K-AKT 경로에 영향을 미침을 추정해볼 수 있었으며 이에 대해서는 더 심도 있는 연구를 해야 할 것으로 보인다. 이렇게 PLX4032를 처리하였을 때 증가되는 EGFR의 발현 사실을 근거로 8505C에 PLX4032과 EGFR 억제제인 Erlotinib(Tarceva®)를 병합 처리하였을 때 p-AKT와 p-ERK가 모두 효과적으로 억제되어 치료 효과가 있음을 시사하였다.

본 연구를 통해서 저자들은 BRAF(V600E) 돌연변이를 가진 갑상선 역형성암 세포주에서 선택적인 BRAF 억제제를 투여하였을 때 8505C, FRO 세포주마다 다른 반응성을 가진다는 것을 알 수 있었으며, 세포 성장 억제, 세포 이동 억제 및 종양 성장 억제 등의 반응이 떨어지는 8505C 세포주에서는 BRAF 억제제를 통해 p-EGFR 발현이 증가하여 결과적으로 BRAF 억제에 대한 내인성 저항 기전이 있음을 알 수 있었다. 더 나아가 이러한 p-EGFR 되먹임 조절기전(feedback regulation)에 의해 EMT에 관련하는 vimentin의 증가를 유도함이 세포주의 세포 이동능력에도 영향을 미치고 있음을 확인하였다. 따라서 이와 같이 PLX4032 투여에 대한 저항성을 보이는 BRAF 돌연변이 갑상선 역형성암의 경우 BRAF 억제제 단독요법의 한계를 극복하여 EGFR 억제제와의 병합 투여를 통해 표적 치료의 특이적인 항종양효과를 극대화할 수 있으며 이는 향후 환자에서 최적의 개인 맞춤형 병합 치료법(personalized

combinatorial targeted therapy)를 구축하는 데 많은 임상적인 응용이 가능하리라 판단된다.

**중심 단어 :** BRAF 돌연변이 · EGFR · 상피-간질세포 이행 · 갑상선 역형성암.

## References

- 1) The Korea Central Cancer Registry, National Cancer Center. *Annual report of cancer statistics in Korea in 2011*, Ministry of Health and Welfare; 2013.
- 2) Rosove MH, Peddi PF, Glaspy JA. *BRAF V600E inhibition in anaplastic thyroid cancer*. *N Engl J Med*. 2013;368:684-685.
- 3) Witt RL, Ferris RL, Pribitkin EA, Sherman SI, Steward DL, Nikiforov YE. *Diagnosis and Management of Differentiated Thyroid Cancer using Molecular Biology*. *Laryngoscope*. 2013;123:1059-1064.
- 4) Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. *BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5399-5404.
- 5) Takano T, Ito Y, Hirokawa M, Yoshida H, Miyauchi A. *BRAF V600E mutation in anaplastic thyroid carcinomas and their accompanying differentiated carcinomas*. *Br J Cancer*. 2007;96:1549-1553.
- 6) Hall RD, Kudchadkar RR. *BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies*. *Cancer Control*. 2014;21:221-230.
- 7) Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. *N Engl J Med*. 2011;364:2507-2516.
- 8) Dietrich S, Glimm H, Andrusis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T. *BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia*. *N Engl J Med*. 2012;366:2038-2040.
- 9) Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Lee RJ, et al. *PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors*. *J Clin Oncol*. 2010;28:15s(suppl; abstr 3534).
- 10) Hayes DN, Lucas AS, Tanvetyanon T, Krzyzanowska MK, Chung CH, Murphy BA, et al. *Phase II efficacy and pharmacogenomic study of Selumetinib(AZD6244; ARRY-142886) in iodine-131 refractory papillary thyroid carcinoma with or without follicular elements*. *Clin Cancer Res*. 2012;18:2056-2065.
- 11) Girotti MR, Marais R. *Deja Vu: EGF receptors drive resistance to BRAF inhibitors*. *Cancer Discov*. 2013;3:487-490.
- 12) Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. *Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion*. *Nature*. 2012;487:500-504.
- 13) Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, et al. *EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to*

- RAF inhibition with vemurafenib. Cancer Discov.* 2012;2:227-235.
- 14) Lee J, Hwang JA, Lee EK. *Recent progress of genome study for anaplastic thyroid cancer. Genomics Inform.* 2013;11:68-75.
  - 15) Nehs MA, Nucera C, Nagarkatti SS, Sadow PM, Morales-Garcia D, Hodin RA, et al. *Late intervention with anti-BRAF(V600E) therapy induces tumor regression in an orthotopic mouse model of human anaplastic thyroid cancer. Endocrinology.* 2012; 153:985-994.
  - 16) Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Dominguez JM, Knauf JA, Viale A, Sherman EJ, et al. *Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their anti-tumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. Cancer Discov.* 2013;3:520-533.
  - 17) Baquero P, Sánchez-Hernández I, Jiménez-Mora E, Orgaz JL, Jiménez B, Chiloeches A. *(V600E)BRAF promotes invasiveness of thyroid cancer cells by decreasing E-cadherin expression through a Snail-dependent mechanism. Cancer Lett.* 2013;335: 232-241.